

V. 3125

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
23. Januar 2003 (23.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/006065 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 47/48 (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Truderinger Str. 246, 81825 München (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/02564
- (22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juli 2002 (12.07.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 33 307.2 12. Juli 2001 (12.07.2001) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM [DE/DE]; Stiftung des öffentlichen Rechts, Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRAUN, Klaus [DE/DE]; Bruchhausen 1B, 69207 Sandhausen (DE). WALDECK, Waldemar [DE/DE]; Tilsiter Strasse 49, 69514 Laudendach (DE). PIPKORN, Rüdiger [SE/DE]; Adolf-Rauch-Strasse 3, 69120 Heidelberg (DE). BRAUN, Isabell [DE/DE]; Höhenweg 13, 35091 Cölbe-Bürgeln (DE). DEBUS, Jürgen [DE/DE]; Kreuzstrasse 11, 76698 Stettfeld (DE).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: PNA CONJUGATE FOR THE TREATMENT OF DISEASES ASSOCIATED WITH HIV

(54) Bezeichnung: PNA-KONJUGAT ZUR THERAPIE VON MIT HIV IN ZUSAMMENHANG STEHENDEN ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to peptide nucleic acid (PNA) conjugates which are suitable for the treatment of diseases associated with HIV, the peptide nucleic acid (PNA) inhibiting the gene expression of HIV. The conjugates comprises the following constituents: (a) a transport mediator for the cell membrane, (b) an address protein or peptide for importing into the cell nucleus, and (c) a peptide nucleic acid (PNA) which is to be transported, which can be hybridised with an HIV gene, and which inhibits the expression of the HIV gene.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben werden Peptid-Nukleinsäure(PNA)-Konjugate, die zur Therapie von mit HIV in Zusammenhang stehenden Erkrankungen geeignet sind, wobei die Peptid-Nukleinsäure (PNA) die Genexpression von HIV hemmt. Die Konjugate weisen die folgenden Komponenten auf: (a) einen Transportvermittler für die Zellmembran, (b) ein Adressprotein bzw. -peptid für den Import in den Zellkern, und (c) eine zu transportierende, mit einem HIV-Gen hybridisierbare Peptid-Nukleinsäure (PNA), die die Expression des HIV-Gens hemmen kann.

WO 03/006065 A2

BEST AVAILABLE COPY

PNA-Konjugat zur Therapie von mit HIV in Zusammenhang stehenden Erkrankungen

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptid-Nukleinsäure(PNA)-Konjugate, die zur Therapie von mit HIV in Zusammenhang stehenden Erkrankungen geeignet sind, wobei die Peptid-Nukleinsäure (PNA) die Genexpression von HIV hemmt.

Weltweit schreitet die Inzidenz des „human immunodeficiency virus (HIV) ungeachtet der bisherigen intensiven Forschungsbemühungen zur Entwicklung effektiver Behandlungsverfahren fort. HIV zählt zur lentiviralen Gruppe der Retroviren und ist eines der am intensivsten untersuchten Viren. Der HIV-Infektionszyklus beginnt mit der Bindung viraler Partikel an die Zellmembran der Zielzellen mittels des viralen Hüllproteins gp120/gp41. Zunächst bindet das Virus an das CD4-Protein, danach folgt eine Anbindung an den obligatorischen Korezeptor, wobei es sich um ein Mitglied der Chemokin-Rezeptor-Familie handelt. Hauptziele der HIV-Infektion sind T-Helferzellen und Makrophagen. Dabei durchdringt der virale „Core“-Komplex die Zelle und das Virus integriert in das virale Genom in mehreren Schritten (reverse Transkription, Eintritt in den Zellkern, Integration in die Chromosomen der Wirtszellen als DNA-Doppelstrang). Ab diesem Zeitpunkt ist HIV permanenter Bestandteil des zellulären Genoms und kann als erworbene genetische Erkrankung betrachtet werden. HIV ist in der CD4⁺-Zelle nicht in der Lage zu replizieren und benötigt zur „Initialzündung“ seiner Promotoren in der regulatorischen Region (LTR) zelluläre Transkriptionsfaktoren zur Transkription früher regulatorischer mRNAs, die für Tat-, Rev- und Nef-Proteine kodieren. Das Transaktivatorprotein Tat ist in der frühen Phase der HIV-RNA-Synthese von besonderer Bedeutung. Die Tat-Proteinkonzentration korreliert direkt mit der Menge an HIV-RNA. Die Wechselwirkung zwischen Tat und TAR kann auch zu einer stark erhöhten *trans*-Aktivierung der viralen Genexpression führen, indem die Initiation der Transkription als auch die Elongation induziert werden.

Bisherige Therapieansätze, die eine kausale Behandlung zum Ziel hatten, brachten keinen entscheidenden Durchbruch bei der Bekämpfung von HIV-

Infektionen. Medikamentöse Therapien waren bisher weder in der Lage, HIV-Infektionen zu stoppen noch hierdurch hervorgerufene Krankheiten zu heilen. Immunologische Strategien, z.B. Impfungen, waren aufgrund der hohen Variabilität der Expressionsmuster der HIV-Virushüllproteine jedoch bisher auch nicht erfolgreich und erscheinen auch weiterhin wenig erfolgversprechend. Ein anderer theoretischer Therapieansatz basiert auf einer molekularen Virusinaktivierung, z.B. über Antisense-RNAs zur Blockierung viraler Nukleinsäuren. Zwar bietet sich gerade bei HIV dieser Therapieansatz an, aber dieser scheint gerade wegen der transienten Kontrolle des HIV-Infektionszyklus und dem bisher kaum bekannten viralen Expressionsmuster sehr problematisch. Auch mit Ribozymen scheint eine HIV-Proliferationskontrolle nur sehr schwer realisierbar, da für eine solche Strategie spezielle geeignete CUG-Sequenzen des Virusgenoms identifiziert werden müssen (da die Ribozyme nur an diesem Sequenzmotiv schneiden), dies erscheint vor allem im Hinblick auf die sehr hohe Mutationsrate von HIV aber als äußerst schwierig.

Bei all den vorstehend diskutierten Vorgehensweisen taucht außerdem das Problem des wirksamen Einschleusens der Antisense- bzw. Ribozym-Moleküle an den Zielort auf. Die bisher dazu verwendeten Vektoren, z.B. Adeno-assoziierte Viren (AAV), weisen zahlreiche Nachteile auf. AAV sind kleine Parvoviren mit Einzelstrang-DNA. Ihr Potential liegt in ihrer Fähigkeit, teilende wie auch nicht-teilende Zellen infizieren und sich ins Wirtsgenom integrieren zu können. Der Hauptnachteil liegt jedoch in der mangelnden Synthese ausreichender Mengen und mangelnder Stabilität als Vektor für hämatopoietische Zellen. Auf MLV („murine leukemia virus“) basierende Vektoren wurden ebenfalls in zahlreichen klinischen Studien getestet. Sie scheinen zwar untoxisch und theoretisch als möglicher Carrier für Antisense-Konstrukte geeignet zu sein, weisen jedoch den Nachteil auf, daß im Wirt nur sehr geringe Titer erreicht werden. Schließlich könnten noch auf LV (Lentiviren) basierende Vektoren in Frage kommen, allerdings ist bei diesen der große Nachteil, daß sie nur nicht-proliferierende Zellen infizieren können. Diese Eigenschaft würde zwar die Superinfektion HIV-infizierter Zellen erlauben, aufgrund ihres natürlichen viralen Tropismus sind sie jedoch trotzdem ungeeignet.

Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Mittel bereitzustellen, die eine spezifische und effiziente auf einer Hemmung der Genexpression von HIV basierende Therapie erlauben.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgte durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen.

Von den Erfindern wurde zur Erzielung der Lösung des technischen Problems ein Konjugat entwickelt, das die folgenden Komponenten umfaßt:

- einen Transportvermittler für die Zellmembran ("P"),
- ein Adressprotein bzw. -peptid ("AP") für den Import in den Zellkern, und
- eine zu transportierende , mit einem HIV-Gen hybridisierbare Peptid-Nukleinsäure, die dessen Expression hemmt („PNA“)

Dieses modular aufgebaute Konjugat weist zwei entscheidende Vorteile auf:

(a) Mittels der Komponenten „P“ und „AP“ wird ein effizienter und gerichteter Transport der PNA zu dem Zielort und somit eine Gentherapie ermöglicht. Diese Komponenten erlauben nicht nur einen schnellen und effektiven Transport von Makromolekülen wie PNA durch Zellmembranen lebender Zellen ins Zytoplasma, sondern auch, nach zytoplasmatischer Aktivierung von Adresspeptidsequenzen, einen effizienten Transport in den Zellkern.

(b) Der Einsatz der protease- und nukleaseresistenten Peptid-Nukleinsäuren (PNA), bei denen es sich um Oligonukleotid-Derivate handelt, bei denen das Zuckerphosphat-Rückgrat bevorzugt durch Ethyl-Amin verbundene α -Amino-Ethyl-Glycin-Einheiten substituiert ist, erlaubt aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften unter physiologischen Bedingungen eine stabile und effiziente Blockierung der Transkription des gewünschten Gens. Mit diesen PNAs wird eine auf dem Antisense-Prinzip basierende Anti-Gen-Strategie verfolgt, bei der jedoch nicht die mRNA sondern das Gen selbst, beispielsweise ein virales DNA-Intermediat oder die in genomische DNA des Wirts integrierte virale DNA, das Ziel

ist. Dabei hybridisieren die PNAs über die Bildung einer Triple-Helix an die Ziel-DNA. Der Zielbereich kann einerseits ein transkribierter Bereich der Ziel-DNA sein, andererseits ein regulatorischer Bereich, dessen Blockierung über die PNAs ebenfalls die Transkription hemmt.

Bezüglich Verfahren zur Herstellung der einzelnen Komponenten der Konjugate und zu deren Verknüpfung wird auf die deutsche Patentanmeldung Nr. 199 33 492.7 verwiesen. Die Synthese von PNAs ist dem Fachmann bekannt und z.B. auch in Nielsen et al., Science 254 (1991), 1497-1500, beschrieben.

Der Aufbau des erfindungsgemäßen Konjugats ist vorzugsweise:

P - AP – (HIV-PNA)

ganz bevorzugt mit einem Spacer ("SP"):

P - AP - SP – (HIV-PNA)

Den Transportvermittler für die Zellmembran (vorstehend mit "P" abgekürzt) stellt ein Peptid bzw. Protein dar, das die Plasmamembran überwinden kann. Die Länge dieses Peptids bzw. Proteins unterliegt keiner Beschränkung, solange es die obige Eigenschaft aufweist. Beispiele für "P" stammen vorzugsweise aus der Penetratin-Familie (Derossi et al., Trends Cell Biol. 8 (1988), S. 84-87) oder sind Transportan bzw. Teile davon (Pooga et al., The FASEB Journal 12 (1998), S. 68 ff.), wobei solche aus der Penetratin-Familie bevorzugt sind. Ein Beispiel für "P" stellt ein Penetratin mit der folgenden Sequenz dar:

NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-

Hergestellt wird die ausgewählte "P"-Sequenz auf biologischem Weg (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach dem Merrifield-Verfahren

(Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149).

Die Auswahl des Adressproteins bzw. -peptids (vorstehend mit "AP" abgekürzt) kann der Fachmann anhand der bekannten Aminosäuresequenzen für den Import in den Zellkern steuernde Peptide bzw. Polypeptide auswählen. Prinzipiell unterliegt die Länge dieses Adresspeptids bzw. -proteins keiner Beschränkung, solange es die Eigenschaft aufweist, einen zellkernspezifischen Transport zu gewährleisten. Für die Einbringung der PNAs werden im allgemeinen "AP" ausgewählt, die ein zellkernspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch die PNAs in den Zellkern dirigieren. Grundsätzlich ist für den Transport in den Zellkern die reine Adressequenz ausreichend. Es können aber auch "AP" ausgewählt werden, die über eine zellkernspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese Spaltstelle liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach Erreichen des Zellkerns das Abspalten der Adressequenz sicherzustellen. Hergestellt wird die ausgewählte "AP"-Sequenz auf biologischem (Reinigung natürlicher Transportvermittlerproteine oder Klonierung und Expression der Sequenz in einem eukaryontischen oder prokaryontischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf synthetischem Weg, z.B. nach dem Merrifield-Verfahren (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149). Beispiele für geeignete Adressproteine bzw. -peptide sind:

-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val; und

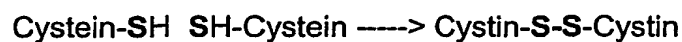
H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-

(= „Nuclear localisation sequence“ aus SV40-T-Antigen)

Weiter kann das Konjugat ggf. einen Spacer (vorstehend mit "SP" abgekürzt) enthalten, der sich vorzugsweise zwischen dem Adressprotein/-peptid und der zu transportierenden Peptid-Nukleinsäure (PNA) befindet. Er kann aber zusätzlich oder alternativ auch zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein vorliegen. Der Spacer dient dazu, ggf. vorhandene sterische Wechselwirkungen zwischen den Komponenten aufzuheben bzw. günstig zu beeinflussen. Der Spacer kann beispielsweise ausgewählt sein aus: Glycin, Polylysin,

Polyethylenglykol (PEG), Derivate⁶ der Poly-Methacrylsäure oder Polyvinylpyrrolidon (PVP).

Zwischen dem Transportvermittler und dem Adressprotein/-peptid ist vorzugsweise eine Redoxspaltstelle, z.B. -Cystein-S-S-Cystein-O-N-H-. Die zwischen Transportvermittler und Adressprotein entstehende Bindung ist eine Redoxkopplung (schonende zellimmanente Verknüpfung mittels DMSO; Rietsch und Beckwith, Annu. Rev. Genet. 32 (1998), 163-84):



Die Peptid-Nukleinsäure (PNA) erlaubt die Hemmung der Transkription von für HIV essentiellen Genen, z.B. dadurch, daß sie mit einem Bereich eines Gens hybridisiert, der transkribiert wird, oder einem regulatorischen Bereich, d.h. einem Bereich, der für die Aktivierung der Expression eines bestimmten Gens bzw. bestimmter Gene verantwortlich ist. Geeignete Gene bzw. geeignete Bereiche können vom Fachmann anhand der bisher bekannten Gene von HIV bzw. deren Funktion identifiziert werden. Vorzugsweise weisen die Peptid-Nukleinsäuren eine Länge von mindestens 18 Basen auf, besonders bevorzugt sind Peptid-Nukleinsäuren mit einer Länge von mindestens 20 Basen. Die Peptid-Nukleinsäure kann ggf. auch markiert sein, z.B. radioaktiv (z.B. mit einem alpha-, beta- oder gamma-Strahler gekoppelt), mit einem Farbstoff, mit Biotin/Avidin usw.

Die Synthese der Konjugatbestandteile "P" und "AP" erfolgt vorzugsweise synthetisch nach dem Merrifield-Verfahren (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85 (1963), 2149) Die Ankopplung der anderen Bestandteile (z.B. Spacer und/oder PNA) daran erfolgt durch kovalente chemische Bindung. Die Einfügung der Redoxspaltstelle zwischen "P" und "AP" erfolgt auf chemischen Wege durch die oben erwähnte Redoxkopplung. Auch zwischen einem ggf. vorhandenen Spacer und der PNA bzw. dem Adressprotein und der PNA liegt eine kovalente Bindung vor, bevorzugt eine Säureamid-Bindung. Mögliche Alternativen sind Ether- oder Ester-Bindungen, je nach den in der zu konjugierenden Substanz vorhandenen funktionellen Gruppe(n).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats hybridisiert die Peptid-Nukleinsäure (PNA) mit dem HIV-tat-Gen oder HIV-rev-Gen. Basierend auf dem speziellen viralen Zyklus von HIV stellen die tat- und rev-Gene zwei bevorzugte molekulare Ziele für eine Anti-HIV-Therapie dar. Die Produkte beider Gene agieren als essentielle Regulatorproteine zur *trans*-Aktivierung der HIV-Genexpression, indem sie an HIV-mRNA binden. Tat bindet an TAR („trans-activating-response-element“), nahe dem 5'-Ende der HIV-RNA und Rev interagiert mit RRE („Rev-responsive-element“) des env-Gens.

Die genomische Organisation von HIV-1 ist in Fig. 1 gezeigt.

Die für HIV-1 codierenden Sequenzen sind in Ratner et al., Nature 313, S. 277-284 (1985) veröffentlicht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Konjugats hybridisieren die PNAs mit Sequenzen der LTR-Region von HIV-1 (Fig. 2). Vorteilhafte PNAs umfassen die nachfolgenden Sequenzen:

TTATTTCTCTTTTGTTG
ATTAC*TAC*GTC*TC*TC*C*GTT
TATC*GGTTTTTAAC*GTC*C*C*
TC*C*TTTTC*C*C*C*GAC*AAC*C*TTTAC*

C* = Pseudo-Isocytosin

Die Verwendung von Pseudo-Isocytosin hat den Vorteil, daß eine pH-unabhängige Hybridisierung möglich ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform richten sich die PNAs gegen den Polypurin-Tract, zentralen DNA-Flap, Nef oder NCp7 (Vpr, Vpu) [s. Fig. 7]. Hierzu wurden von den Erfindern verschiedene Experimente durchgeführt, die in den Fig. 9 bis 13 gezeigt sind.

Bevorzugte PNAs gegen die vorstehend genannten Bereiche sind:

Sequenzen HIV-1 (es wird hier auf die Fig. 7-13 Bezug genommen)

Abkürzungen:

L = Linker;

J = Pseudoisocytosin oder Cytosin

Für HIV :

c-PPT und 3'-PPT 4821-36 / 9116-31 (allg. Sequenz):

PNA I

(Polypurintrakt)

N- TCC CCC CTT TTC TTT T- **L** -TTT TTT T

c-PPT target:

DNA (+) or RNA 4821-39

N- CA ATC CCC CCT TTT CTT T- **L** -TT TTT TT

PNA Ia

1) nbIaNLS+

2) nbIaNLS-

N- CA ATC CCC CCT TTT CTT T

(dieselbe Sequenz ohne Linker-Teil)

PNA Ib

3) nbIbNLS+

4) nbIbNLS-

DNA (-) 4800-20

N- GTA TTC ATC CAC AAT TTT

PNA II

5) nbIIaNLS+

6) nbIIbNLS-

DNA (+) 4800-20

N-AAA TTG TGG ATG AAT ACT

PNA III

7) nbIIIaNLS+

8) nbIIIbNLS-

Flap:

PNA IV

DNA (-)

4861-80

N- TAG TAG ACA TAA TAG CAA

PNA IVa

9) nbIVaNLS-

Eine andere DNA (-) zwischen c-PPT and Tar, um die Länge des "Flap" zu verkürzen:

DNA (+) 4841-60

N- TCC CCT GCA CTG TAC CCC

PNA IVb
10) nbVbNLS-

Nef:

PNA V

DNA (-)
9095-9115

N-AGA TCT TAG CCA CTT TTT-C

PNA Va
11) nbVaNLS+

9136-56

N-GGC TAA TTC ACT CCC AAC-C

PNA Vb
12) nbVbNLS+

IN site (3') 9746-66:

N- TAG AGA TTT TCC ACA CTG

PNA Vc
13) nbVcNLS+

Seq is gerichtet gegen den Start von gag:

N- cac cca tct ctc tcc ttc (kein Linker)

PNA VI
14) nbVINLS-

splice acceptor site:

N-jtt jtt-L-ttc ttc ctg cca tag

PNA VII
15) nbXNLS+
16) nbXNLS-

TAR:

N-cag gct caa atc tgg tct-L-tjt

PNA VII
17) nbXNLS-

NCp7:

N-ATT ACT ACG TCT CTC CGT (nicht getestet)

PNA VIII
18)smVIIIaNLS+

N-TAT CGG TTT TTA ACG TCC

19)smVIIIaNLS+

N T TTT JJT- linker -TCC TTT TCC CCG ACA ACC

20)smVIIc NLS+

Random Sequenz als Kontrolle :

PNA IX

N-CAT ACT TGA CTC GTT ATC-C

21) IX NLS-

N-CAT ACT TGA CTC GTT ATC-C

22) IX NLS+

BDV PNA: (diese Sequenz wurde für das BDV spreading getestet; Fig. 8)

N- TCC CTA CGC CGC CTT CTC-C terminus

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform richten sich die PNAs (z.B. PNA VI oben) gegen die virale RNA, wobei das molekulare Target die Gag-Splice-Akzeptorstelle darstellt.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich auch ein erfindungsgemäßes Konjugat, gegebenenfalls zusammen mit einem geeigneten Träger, enthaltendes Arzneimittel sowie dessen Verwendung zur HIV-Therapie. Als geeignet hat sich dabei insbesondere die parenterale oder intravenöse Applikation herausgestellt.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren beschrieben, welche zeigen:

- Fig. 1: genomische Organisation von HIV-1
- Fig. 2: Sequenzen der LTR-Region von HIV-1
- Fig. 3: Plasmid-Karte von pEGFP-C3
- Fig. 4: Virale Angriffsorte der Pseudo-Isocytosin enthaltenden PNAs
- Fig. 5: CLSM-Aufnahmen (Nicht aktivierte Kontrolle in HeLa)
- Fig. 6: CLSM-Aufnahmen (Nach Aktivierung in HeLa)
- Fig. 7: PNA-„Targets“
- Fig. 8: Untersuchung von BDV (Borna disease virus; retrovirus) anstatt von HIV zum Beweis, daß auch andere Retroviren durch PNA-Konstrukte inhibierbar sind
- Fig. 9: Effizienz von PNA in der frühen Phase viraler Infektion
Der biologische Effekt wurde gemessen durch Transaktivierung eines Reporter-Genkonstrukts (LacZ)
- Fig. 10: Ergebnisse des Reporter-Genassays nach Behandlung mit verschiedenen PNAs. Signifikante Ergebnisse wurden mit PNAs gegen cPPT (Polypurin-Tract) gesehen
- Fig. 11: Verwendung von PNAs in der frühen und späten Phase viraler Infektion; Testung durch ELISA gegen p24 Virenprotein. Verschiedene PNAs gegen cPPT/Flap/Nef/gag/Random waren fähig, das virale p24 drastisch zu reduzieren
- Fig. 12: Reporter-Genassay mit anti-FLAP PNA kombiniert mit anderen PNAs. Die Kombination von PNA[IV b] + PNA [IIINLS] + PNA [V b]

(500 nM Konzentration) resultierte in optimaler β -Gal Reduktion.

Fig. 13: Chronisch HIV infizierte Zellen wurden nach PNA Behandlung durch viralen p24 ELISA untersucht (72 und 144 Std. nach PNA-Applikation). Der beste Effekt wurde bei cPPT (Polypurin-Trakt) durch PNA [IINLS] erhalten.

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben.

Beispiel 1

Der HIV-1 „long terminal repeat“ (LTR) codiert für den Transkriptionspromotor. Sequenzanalysen belegen die Existenz einer einzigen LTR Enhancer-Promotor Konfiguration für sämtliche bisher untersuchten HIV-1 Subtypen. Transkriptionsstudien mit EGF-Reporter-Konstrukten zeigen seine Funktionalität.

LTR-EGF-Konstrukt:

Basierend auf Biocomputing Daten wurden mit dem HUSAR-Programm des DKFZ, dem SRS (Sequence Retrieval System) und dem multiplen Alignment-Algorithmus (MALIGN) repräsentativ die Sequenz AC S72615, die den HIV-Subtyp HIV4B6 betrifft, ausgewählt (Shiramizu et al., Cancer Res. 54, S. 2069-2072 (1994)).

HIV4B6-LTR:

CCAATAAAGG AGAAAACAAC TGCTTGTTAC ACCC₍₋₁₈₎TATAAG
CCAGCATAAA GC₍₊₁₎ATG GA

Das Ase I (8/-52)-Nhe I (64/+1)-LTR-Fragment wurde gemäß dem bekannten Phosphoramidit-Verfahren synthetisiert und in eine pEGFP-C3/Variante (ohne PCMV) (Fig. 3) (Fa. Clontech, Heidelberg) einkloniert.

Einkloniertes Fragment:

3'-(52)CCAATAAAGG AGAAAACAACTGCCTTGTTAC ACCC(18)TATAAG
CCAGCATAAA GC-5'

Als nächstes wurde die Plasmid-DNA in E.coli in LB-Amp-Kulturmedium unter Ampicillin-Selektionsdruck vermehrt. Die Isolation und Aufbereitung der Plasmid-DNA wurde mit dem Mini-Prep-DNA Kit (Fa. Clontech) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

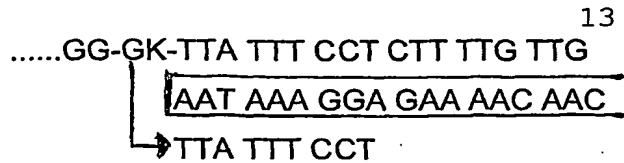
Zellkultur und Transfektions-Assay:

Verwendet wurde die humane Cervix-Karzinom Suspensions-Zelllinie HeLa-S (Tumorbank DKFZ). Die Zellen wurden in MEM“Joklik“ (Minimal Essential Medium; Fa. Sigma) mit 10% FCS (Fa. Sigma), Glutamin (Fa. Gibco) in einer CO₂ Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

Es wurde folgendes „Shuttle-Konstrukt“ hergestellt:

RQQIKIWFQNRRMKWKK-SS-PKKKEKV-GG-GK-TTA TTT CCT CCT TTG TTG
 TTA TTT CCT (= zur Stabilisierung)

Dieses Konstrukt wurde nach dem Protokoll von Britten und Kohne (Science, Vol. 161, No. 3841, S. 529-540, 1986) in die HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektion der HeLa-S erfolgt durch direkte Zugabe des „Shuttle-Konstrukts“ in das Kulturmedium, in einer Konzentration von 100 pM, über 3 Stunden bei 37°C unter Inkubation in 5% CO₂-Atmosphäre. Danach erfolgte die Hybridisierung mit dem LTR-EGF-Konstrukt analog dem oben erwähnten Britten und Kohne-Protokoll. Dabei entsteht folgender „Komplex“:



Die Kultivierung der HeLa-S Zellen erfolgt in 8-Kammer Glasplatten in Petrischalen unter 5% CO₂ bei 37°C über 48 Stunden.

Zur Aktivierung des Plasmids ist es notwendig, das „Shuttle-System“ von der Plasmid-DNA zu trennen. Hierzu werden die Platten über 1 Minute auf 45°C im Wasserbad erhitzt. Nach Mediumwechsel werden die HeLa-S-Zellen weiterkultiviert. Die Transkriptionsbestimmung von GFP unter LTR-Kontrolle erfolgt mittels Fluoreszenz-Reader-Analyse nach 48, 72 und 96 Stunden (Anregung: 488 nm; Emission: 520 nm). Die Lokalisierung des GFP mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) erfolgt analog, jedoch in 8-Kammer-Glasplatten in Petrischalen unter 5% CO₂ bei 37°C über 48, 72 und 96 Stunden (Anregung: 488 nm; Emission: 520 nm). Die Ergebnisse sind in Fig. 5 und 6 gezeigt.

Beispiel 2

Hier ist eine Methode beschrieben, die erlaubt, einen PNA Effekt in einer frühen Infektionsphase von HIV-1 zu bestimmen. Es wird hier Bezug auf die Fig. 9-11 genommen.

Als Modell wurden HeLa Zellen verwendet, die mit einem stabil exprimierten LacZ Reportergen transfiziert wurden. Durchgeführt wurde der Test in einem 96-Wellplate. HeLa Zellen werden in RPMI Medium suspendiert und ausplattiert. Die Zellzahl war 20000 Zellen pro Well. Das Pipettiervolumen beträgt 100 µl/Well. Getestet wurden 18 unterschiedliche PNA-Sequenzen (s. Fig. 10) plus eine Kontrolle (X = weitere virale Kontrolle (z.B. BDV)). Die PNA-Konstrukt-Konzentration waren 10 pM, 100 pM und 1 nM. Die PNA-Konstrukte waren analog Beispiel 1 hergestellt. Nach einer Stunde erfolgte dann die virale Infektion. Der virale Effekt auf den LTR Promotor wurde über die LacZ Aktivität mittels

Photometer ermittelt.

Patentansprüche

1. Konjugat zur Vermittlung eines zellkernspezifischen Transports einer an ein transkribiertes oder ein an der Regulation der Genexpression beteiligtes HIV-Gen oder einen Teil davon hybridisierbaren Peptid-Nukleinsäure (PNA), wobei das Konjugat die folgenden Komponenten aufweist:
 - einen Transportvermittler für die Zellmembran,
 - ein Adressprotein bzw. -peptid für den Import in den Zellkern, und
 - eine zu transportierende, mit einem HIV-Gen hybridisierbare Peptid-Nukleinsäure (PNA).
2. Konjugat nach Anspruch 1, wobei der Transportvermittler ein Peptid oder Protein ist, das die Plasmamembran überwinden kann.
3. Konjugat nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Transportvermittler aus der Penetratin-Familie stammt oder Transportan oder Teile davon ist.
4. Konjugat nach Anspruch 3, wobei eines der Penetratine folgende Sequenz hat:

NH₂-RQIKIWFQNRRMKWKK-

5. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Adressprotein bzw. -peptid ausgewählt ist aus:
 - Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val,; und
 - H₃N⁺-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-(= Nuclear localisation sequence aus SV40-T-Antigen)
6. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Konjugat folgenden Aufbau hat:

Transportvermittler - Adressprotein - Peptid-Nukleinsäure (PNA)

7. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei ggf. weiter ein Spacer vorhanden ist.
8. Konjugat nach Anspruch 7, wobei sich der Spacer zwischen dem Adressprotein und der Peptid-Nukleinsäure (PNA) befindet.
9. Konjugat nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Spacer Polylysin, Polyethylenglykol oder Polyvinylpyrrolidon ist.
10. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Peptid-Nukleinsäure mit dem HIV-tat-Gen oder HIV-rev-Gen oder einem Teil davon hybridisiert.
11. Konjugat nach Anspruch 10, wobei die Peptid-Nukleinsäure eine Sequenz ausgewählt aus der folgenden Gruppe umfaßt:
TTATTTCTCTTTTGTTG
ATTAC*TAC*GTC*TC*TC*C*GTT
TATC*GGTTTTTAAC*GTC*C*C*
TC*C*TTTTTC*C*C*C*GAC*AAC*C*TTTAC*
(mit: C* = Pseudo-Isocytosin)
12. Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Peptid-Nukleinsäure gegen den Polypurin-Tract, zentralen DNA-Flap, Nef , NCp7; oder die Gag-Splicestelle auf RNA-Ebene gerichtet ist.
13. Arzneimittel, ein Konjugat nach einem der Ansprüche 1 bis 12 enthaltend.
14. Verwendung eines Konjugats nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur HIV-Therapie.

HIV-1

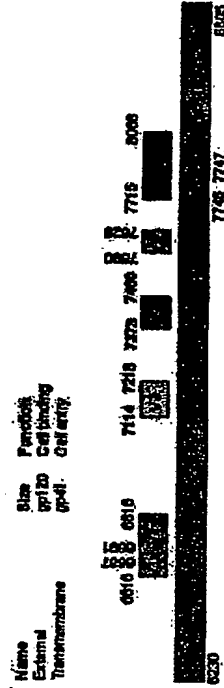
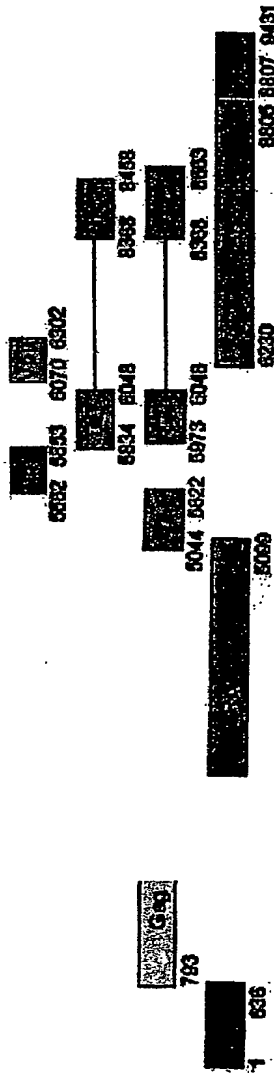
LTR-Kontrollregion, Genom, Protein und Funktionen

WO 03/006065

PCT/DE02/02564

1/13

Fig. 1



Name: Gag Ma.
Size: 1187
Function: membrane anchoring, HIV interaction, nuclear transport of viral core (phosphorylated protein)

Name: Pol
Size: 1187
Function: Reverse transcription, RNAse H activity

Legende: (Wirkorte für Anti-Gen-Strategie)
LTR: Kontroll-Region
Ziel-Gene: Gag, Pol, Tat1, Tat2 (plus Gen-Locus)
Untere Hälfte: Proteinfunktionen

Name: Env
Size: 8336
Function: DNA protein integration

2/13

LOCUS HIVHXB2CG 9719 bp ss-
 DEFINITION Human immunodeficiency virus type 1 (HXB2), complete genome;
 HIV1/HTLV-III/LAV reference genome.
 ACCESSION K03455 M38432
 VERSION K03455.1 GI:1906382
 KEYWORDS TAR protein; acquired immune deficiency syndrome; complete enome; env
 protein; gag protein; long terminal repeat (LTR); pol protein; polyprotein;
 proviral gene; reverse transcriptase; transactivator.
 SOURCE Human immunodeficiency virus type 1.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..9719
 /organism="Human immunodeficiency virus type 1"
 /db_xref="taxon:11676"
 /note="HTLV-III/LAV"
 LTR 1..634
 /note="5' LTR"
 repeat_region 454..551
 /note="R repeat 5' copy"
 mRNA 455..9635
 /note="HXB2 genomic mRNA"
 prim_transcript 455..9635
 /note="tat, trs, 27K subgenomic mRNA"
 intron 744..5777
 /note="tat, trs, 27K mRNA intron 1"
 CDS 790..2292

BASE COUNT 3411 a 1772 c 2373 g 2163 t
 ORIGIN

```

TGGAAGGGCT AATTCAC TCC CAACGAAGAC AAGATATCCT TGATCTGTGG ATCTACCACA      60
CACAAAGGCTA CTTCCTGAT TAGCAGAACT ACACACCAGG GCCAGGGATC AGATATCCAC      120
TGACCTTTGG ATGGTGCTAC AAGCTAGTAC CAGTTGAGCC AGAGAAGTTA GAAGAAGCCA      180
ACAAAGGAGA GAACACCAGC TTGTTACACC CTGTGAGCCT GCATGGAATG GATGACCCGG      240
AGAGAGAAAT GTTAGAGTGG AGGTTTGACA GCCGCCTAGC ATTTTCATCAC ATGGCCCGAG      300
AGCTGCATCC GGAGTACTTC AAGAACTGCT GACATCGAGC TTGCTACAAG GGACTTTCCG      360
CTGGGGACTT TCCAGGGAGG CGTGGCCTGG GCGGGACTGG GGAGTGGCGA GCCCTCAGAT      420
CCTGCATATA AGCAGCTGCT TTTTGCCTGT ACTGGGTCTC TCTGGTTAGA CCAGATCTGA      480
GCCTGGGAGC TCTCTGGCTA ACTAGGGAAAC CCACCTGCTTA AGCCTCAATA AAGCTTGCCCT      540
TGAGTGCCTT AAGTAGTGTG TGCCCGTCTG TTGTGTGACT CTGGTAACTA GAGATCCCTC      600
AGACCCCTTT AGTCAGTGTG GAAATCTCT AGCAGTGGCG CCCGAACAGG GACCTGAAAG      660
CGAAAGGGAA ACCAGAGGAG CTCCTCGAC GCAGGACTCG GCTTGCTGAA GCGCGCACGG      720
CAAGAGGCGA GGGGCGGCGA CTGGTGAGTA CGCCAAAAAT TTTGACTAGC GGAGGCTAGA      780
AGGAGAGAGA TGGGTGCGAG AGCGTCAGTA TTAAGCGGGG GAGAATTAGA TCGATGGGAA      840
AAAATTCGGT TAAGGCCAGG GGGAAAGAAA AAATATAAAT TAAACATAT AGTATGGGCA      900
AGCAGGGAGC TAGAACGATT CGCAGTTAAT CCTGGCCTGT TAGAAACATC AGAAGGCTGT      960
AGACAAATAC TGGGACAGCT ACAACCATCC CTTGAGACAG GATCAGAAGA ACTTAGATCA      1020
TTATATAATA CAGTAGCAAC CCTCTATTGT GTGCATCAAA GGATAGAGAT AAAAGACACC      1080
AAGGAAGCTT TAGACAAGAT AGAGGAAGAG CAAAACAAAA GTAAGAAAAA AGCACAGCAA      1140
GCAGCAGCTG ACACAGGACA CAGCAATCAG GTCAGCCAAA ATTACCTTAT AGTGCAGAAC      1200
ATCCAGGGGC AAATGGTACA TCAGGCCATA TCACCTAGAA CTTTAAATGC ATGGGTAAAA      1260
GTAGTAGAAG AGAAGGCTTT CAGCCCAGAA GTGATACCCA TGTTTTCAGC ATTATCAGAA      1320
GGAGCCACCC CACAAGATTT AAACACCATG CTAACACAG TGGGGGGACA TCAAGCAGCC      1380
ATGCAATAGT TAAAGAGAGC CATCAATGAG GAAGCTGCAG AATGGGATAG AGTGCATCCA      1440
GTGCATGCAG GGCCTATTGC ACCAGGCCAG ATGAGAGAAC CAAGGGGAAG TGACATAGCA      1500
GGAACTACTA GTACCTTCA GGAACAAATA GGATGGATGA CAAATAATCC ACCTATCCCA      1560
GTAGGAGAAA TTTATAAAAG ATGGATAATC CTGGGATTAA ATAAATAGT AAGAAATGTAT      1620
AGCCCTACCA GCATTCTGGA CATAAGACAA GGACCAAAGG AACCTTTAG AGACTATGTA      1680
GACCGTTTCT ATAAACTCT AAGAGCCGAG CAAGCTTCAC AGGAGGTAAA AAATTGGATG      1740
ACAGAAACCT TGTGTTGCCA AAATGCGAAC CCAGATTGTA AGACTATTTT AAAAGCATTG      1800
GGACCAGCGG CTACACTAGA AGAAATGATG ACAGCATGTC AGGGAGTAGG AGGACCCGGC      1860
CATAAGGCAA GAGTTTGGC TGAAGCAATG AGCCAAGTAA CAAATTCAGC TACCATAATG      1920
ATGCAGAGAG GCAATTTTAG GAACCAAGA AAGATTGTTA AGTGTTCAC TGTGTCACAA      1980
GAAGGCACAC CAGCCAGAAA TTGCAGGGCC CCTAGGAAAA AGGGCTGTTG GAAATGTGGA      2040
AAGGAAGGAC ACCAAATGAA AGATTGTACT GAGAGACAGG CTAATTTTTT AGGGAAGATC      2100
TGGCCTTCCT ACAAGGGAAG GCCAGGGAAT TTTCTTCAGA GCAGACCAGA GCCAACAGCC      2160
CCACCAGAAG AGAGCTTCAG GTCTGGGGTA GAGACAACAA CTCCCCCTCA GAAGCAGGAG      2220
CCGATAGACA AGGAACGTGA TCCTTTAACT TCCCTCAGGT CACTCTTTGG CAACGACCCC      2280
TCGTCACAAT AAAGATAGGG GGGCAACTAA AGGAAGCTCT ATTAGATACA GGAGCAGATG      2340
ATACAGTATT AGAAGAAATG AGTTTGCCAG GAAGATGGAA ACCAAAAATG ATAGGGGGAA      2400
TTGGAGGTTT TATCAAAGTA AGACAGTATG ATCAGATACT CATAGAAATC TGTGGACATA      2460

```

Fig. 2

3/13

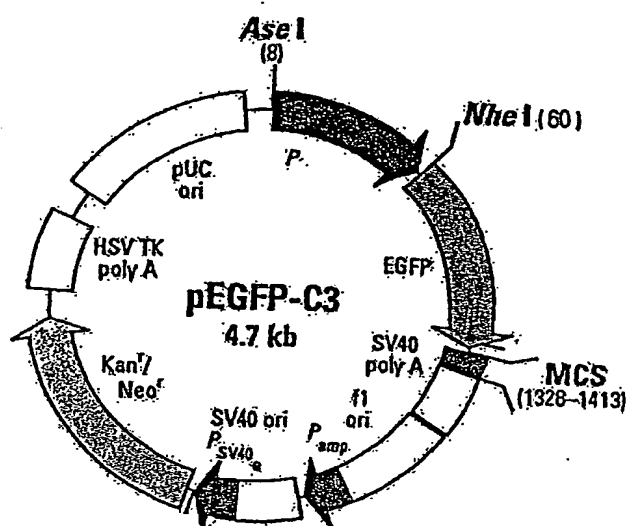


Fig. 3

HIUU70276	G-CCTGGCCATAAAGCAAGAATTTTGGCTGAGGCAATGAGCC
HIUU70291	CATGTCGGGGAGTG GGGAGGACCTAGCCACAAAGCCAGAGTGTTGGCTGAGGCAATGAGCC
HIUU70281	CATGTCASGGAGTG GGG-GGACCCGGCCATAAAGCAAGAGT TTTGGCTGAAGCAATGAGCC
HIVU70290	CATAANGCAAGAGTTTGGCTGAAGCAATGAGCC
HIUU70292	AGTGGGAGGMCCCCGGCCAMAAAGCAAGGGTTTGGCGGAAGCAATGAGCC
HIVU70292	AGTGGGAGGMCCCCGGCCAMAAAGCAAGGGTTTGGCGGAAGCAATGAGCC

HIUU70276 AGGTAACAAATACRGCTG--TAATGATGCAGCGAAACAACCTTTAAGGGT--CAAAGAAA
 HIUU70291 AAGCAAATAATACA---AACATAATGATGCAGAGAAACAACCTTTAAAGGC-CCTAA-AAG
 HIUU70281 AAGTAACACCACCAGCTAACATAATGATGCAGAGAGGCCAATTTTA--GGAACCAAAGAAA
 HIVU70290 AAGTAACAAACCACAGCTACCATAATGATGCAGAGAGGCCAATTTTA--GGAACCAAAGAAA
 HIUU70292 AAGTAACAATTACCTGCCATAATGATGCAGAGAGGCCAATTTTA--GGAACCAAAGAAA
 HIVU70292 AAGTAACAATTACCTGCCATAATGATGCAGAGAGGCCAATTTTA--GGAACCAAAGAAA

HIUU70276 AATTATTAAATGTTTCAACTGTGGCANGGAGGGACAC^{TNA ②}YTAGCAAAAAATTGCAGGGCCCC

HIUU70291 AATTATTAAATGTTTCAACTGTGGCAAGGAAGGGCAC^{TNA ②}TTAGCCAGAAATTGCAGGGCCCC

HIUU70281 GACTGTTAAGTGTTC AATTGTNNDAAGAAGGGCAYATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCC

HIVU70290 GACTGTTAAGTGTTC AATTGBBBVAAGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCC

HIUU70292 AACTGTTAAGTGTTC AATTGTGGCAAGGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCC

HIVU70292 AACTGTTAAGTGTTC AATTGTGGCAAGGAAGGGCACATAGCCAAAAATTGCAGGGCCCC

HIUU70276 TAGGDDGDDGGGCTGTTGGAAATGT--AA
 HIUU70291 TAGGAAAAAGGCTGTTGGAAATGTGGAAAGGAAGGAC
 HIUU70281 TAGGAADAAGGGCTGTTGGAAATGT
 HIVU70290 TAGGAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGTAGGGAAGGACAC
 HIUU70292 TAGGAAAAGGGGCTGTTGGAAATGTGGHAAGGAAGGAM
 HIVU70292 TAGGAAAAGGGGCTGTTGGAAATGTGGHAAGGAAGGAM

- ① ATTAC*TAC*GTC*TC*TC*C*GTT
- ② TATC*GGTTTTTAAC*GTC*C*C*
- ③ TC*C*TTTTC*C*C*C*GAC*AAC*C*TTTAC*

Fig. 4

LTR-EGFP Reportergen

Nicht aktivierte Kontrolle in HeLa

Excit.: 488 nm

Em.: 520 nm

Nukleus: DAPI Färbung

CLSM

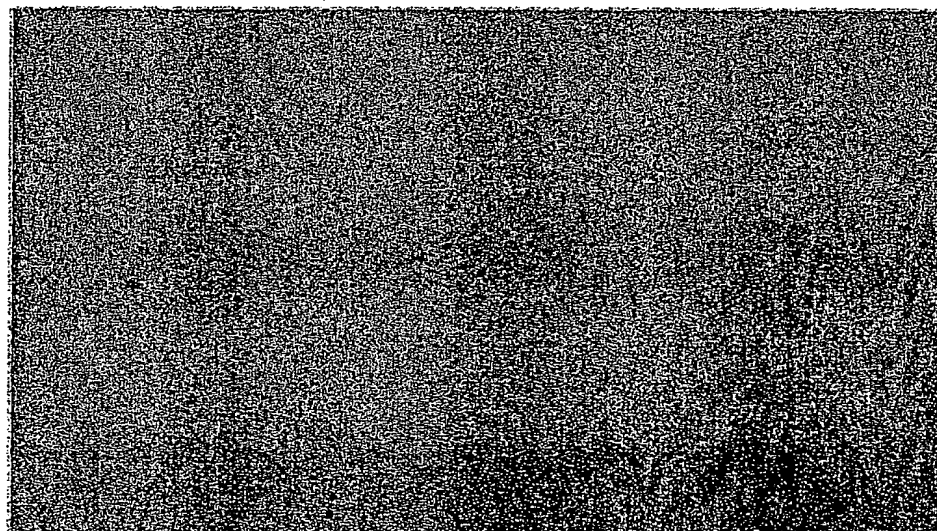
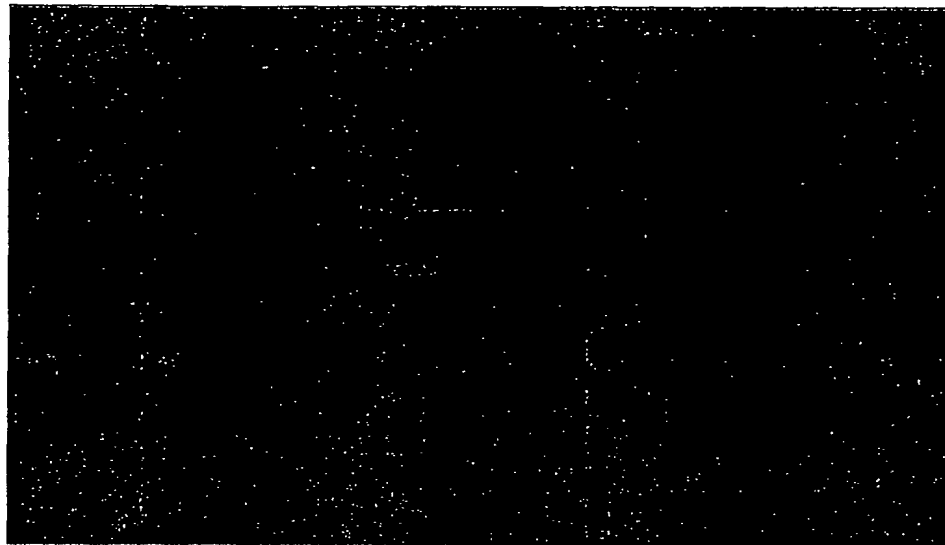


Fig. 5

LTR-EGFP Reportergen

Nach Aktivierung in HeLa

Excit.: 488 nm

Em.: 520 nm

Nukleus: DAPI Färbung

CLSM

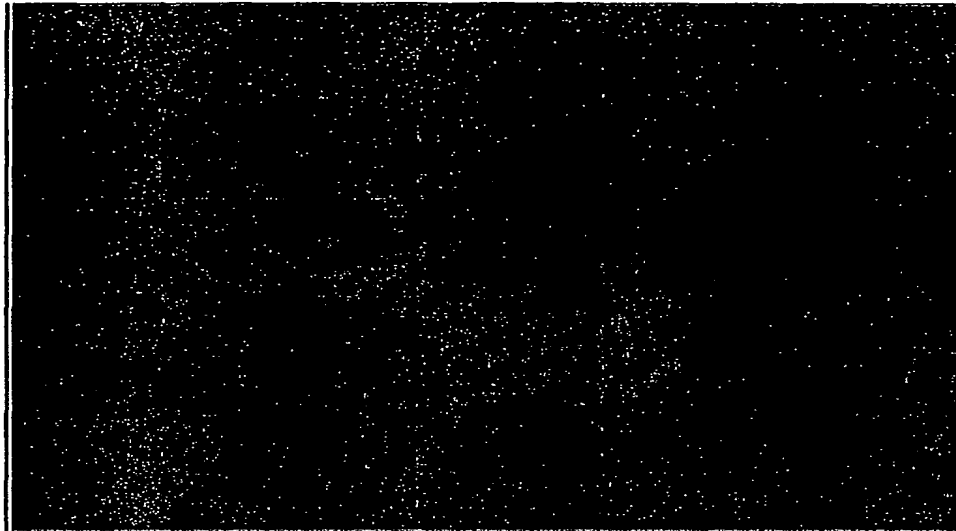
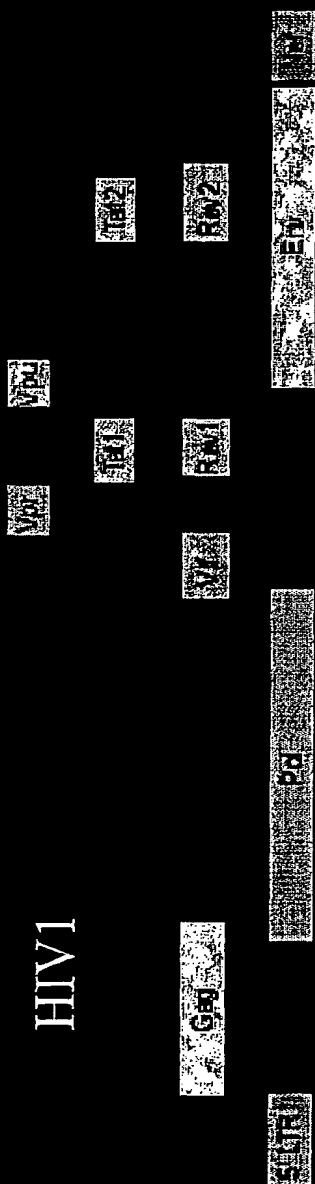


Fig. 6

7/13

PNA Targets

HIV1



PNAS :

a) anti-gene Strategy

-polypurintract (PPT)
-central DNA flap

-Nef
-NCp7

b) mRNA Strategy

-gag splice

acceptor site

1

Fig. 7

8/13

Conclusions

- clear effect on BDV spread in acute infected post-mitotic neurons
- after ~8 days of treatment: Less neurons infected

1µM G-PNA	90% of inhibition
1µM non specific PNA	50% of inhibition

- high viral \square \Rightarrow

persistently infected cells: never 100% inhibition

in FACS analysis shift to healthy population could be seen, never complete
PNA [] 100nM-1µM

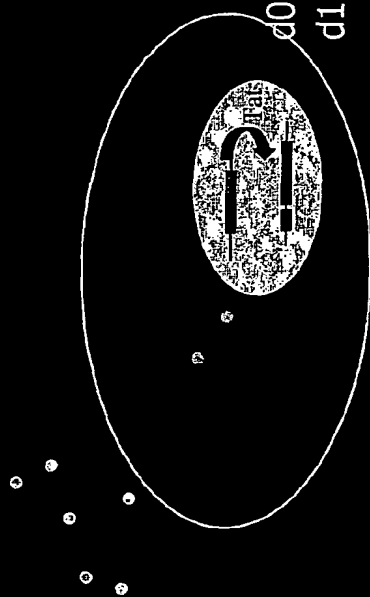
Fig. 8

9/13

Methods: Efficiency of PNAs in the early phase of viral infection

PNA-construct concentrations: 10 μ M; 100 pM; 1nM
 18 different PNAs (with/without NLS)
 + controls:
 infected only with HIV1 or HIV2
 non-infected and non-treated cells
 (each in triplicate)

0.02x10⁶ cells/well in 96 well plates
 100 μ l medium + 10 μ l PNA dilution 100x
 1 hour later viral infection
 d4: readout (chemiluminescent assay)



readout after one round
 of viral replication
 with chemiluminescent assay

transactivation of reporter gene
 induced by viral protein Tat



3

Fig. 9

10/13

Results: β Galactosidase Assay []

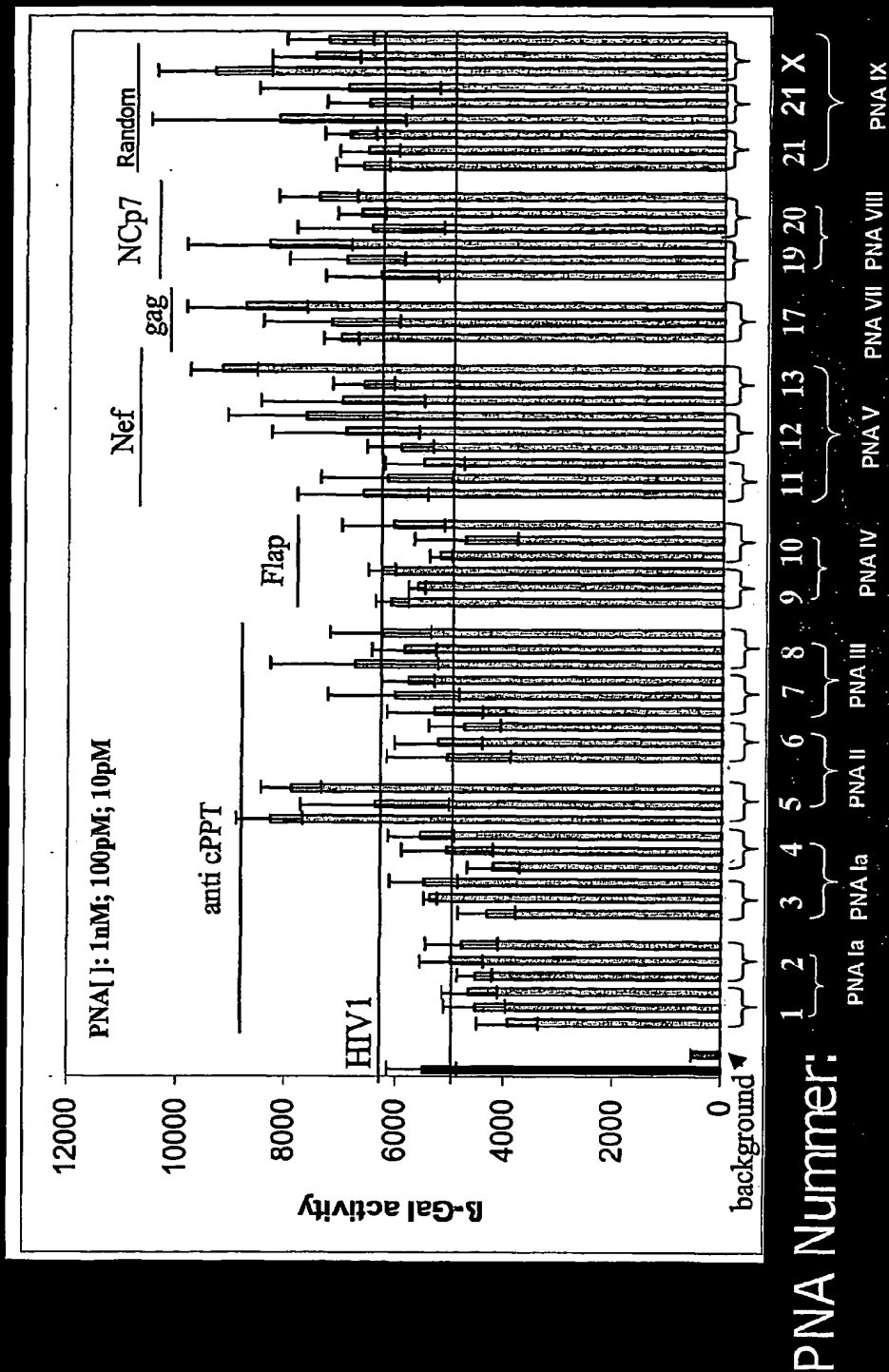


Fig. 10

11/13

Targeting early and late phase of viral infection

HeLa cells were infected chronically with HIV1
plated in 96 well plates and treated with PNAs: [] 100nM and 1µM
48h later: readout with p24 ELISA in the culture supernatant

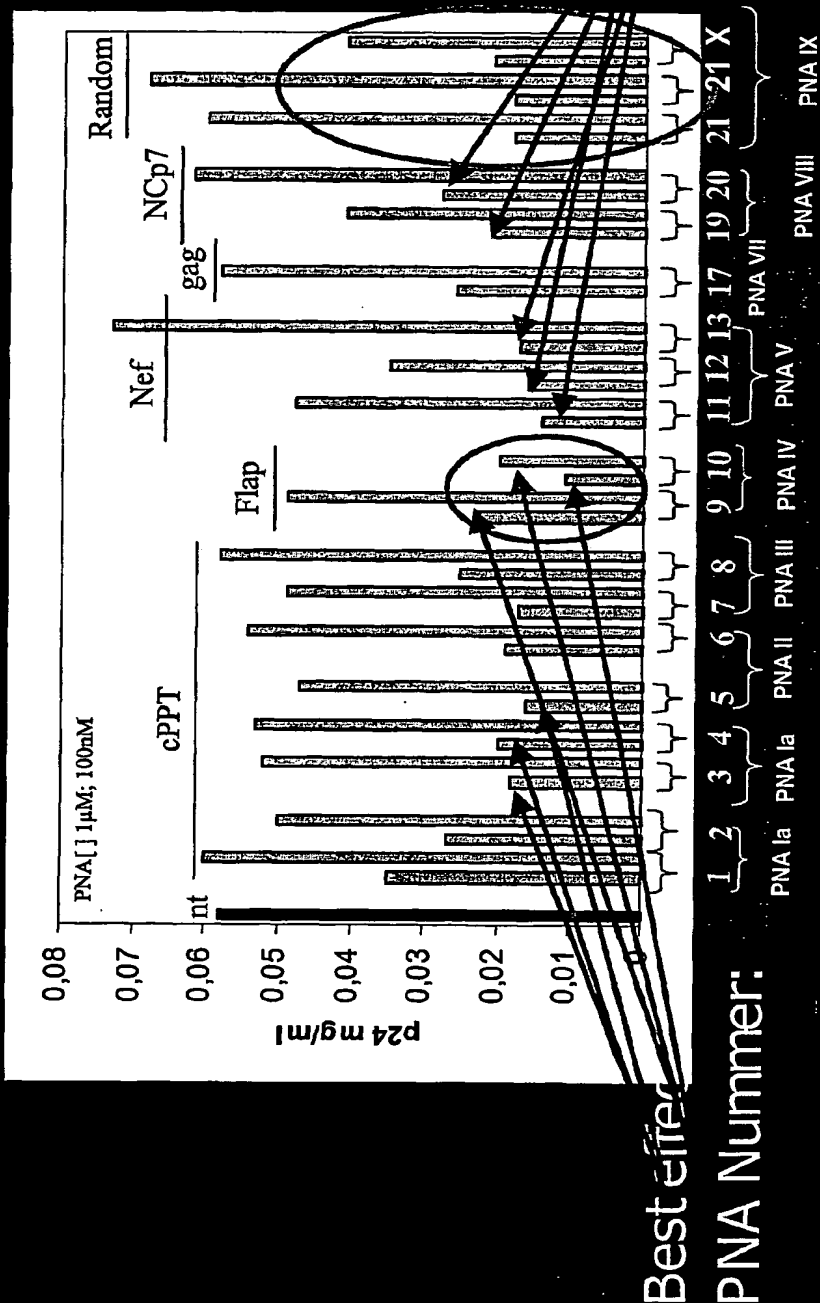
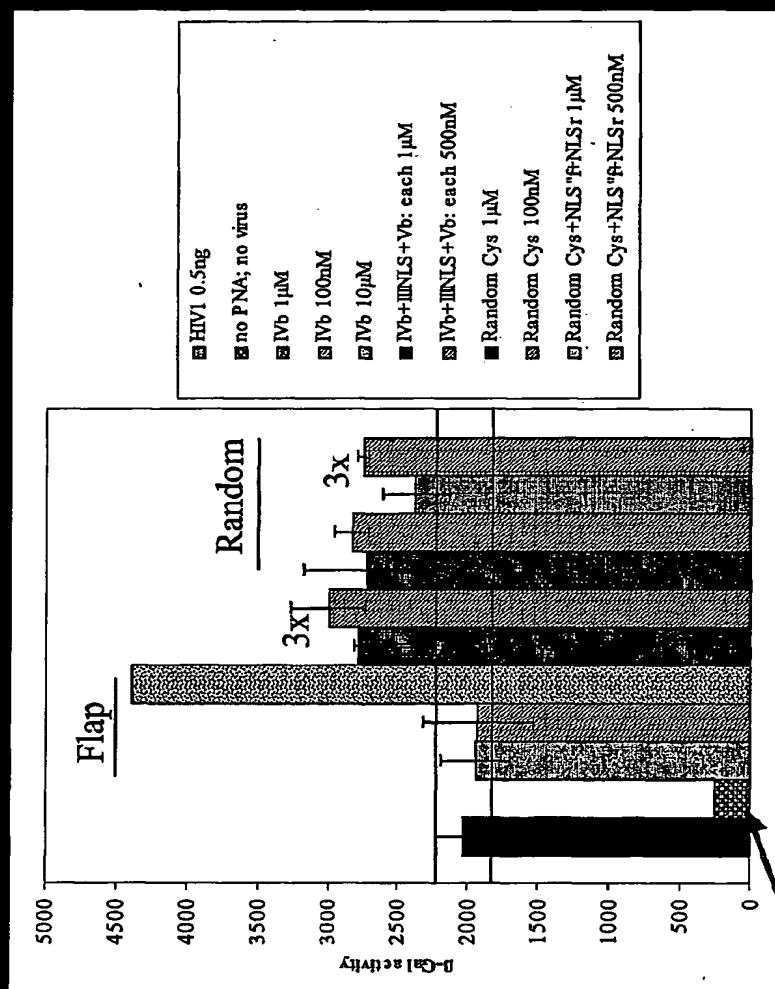


Fig. 11

12/13

8

Further investigation of anti Flap PNA in β -Galactosidase assay
(+ combination with other PNAs)



Kombination IVb + III NLS + Vb:
Best effect: NA Nummer 10 + 3 + 12

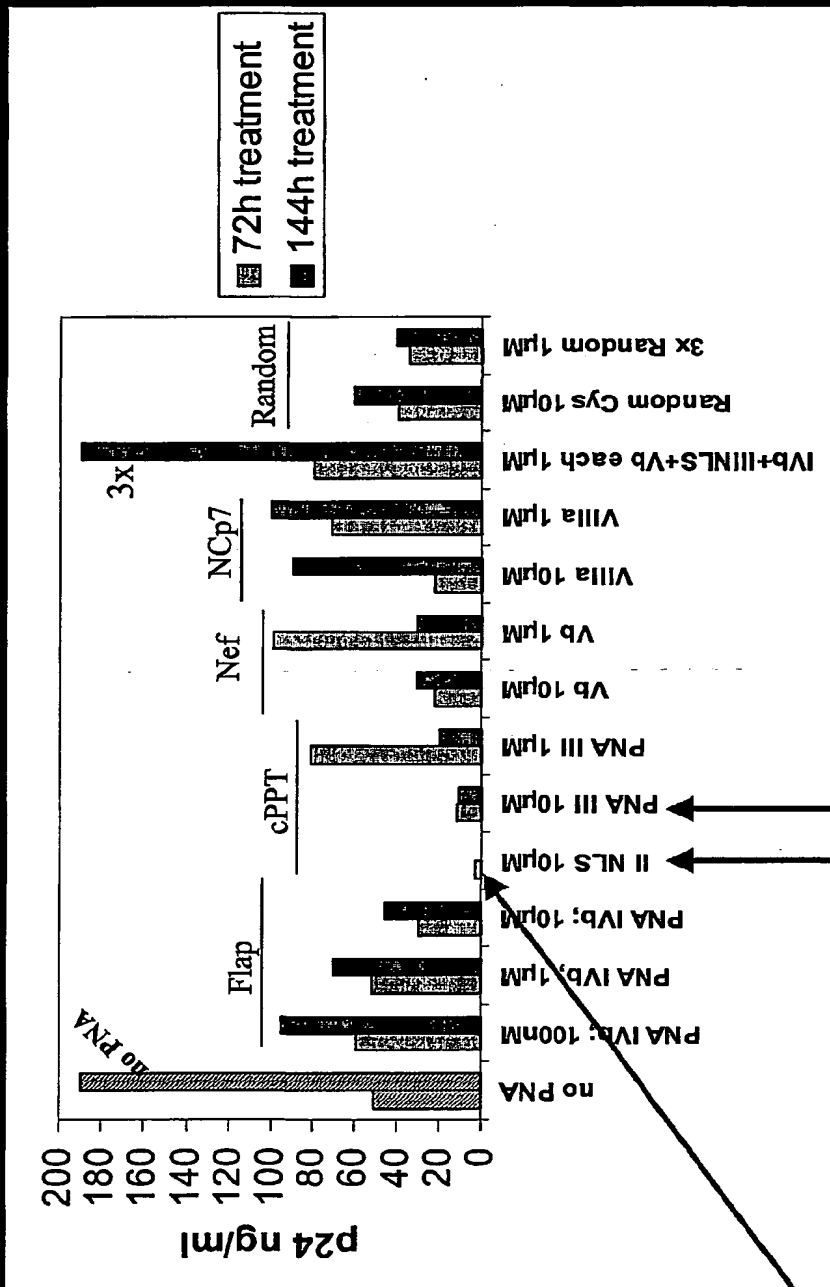
Fig. 12

p24 ELISA on chronically infected cells (two timepoints)

d0: incubation with PNAs; higher []

d3: p24 ELISA

d6: p24 ELISA



Best effect

PNA Nummer 6 7

Fig. 13

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)